

# 不同浓度 $\beta$ -胡萝卜素对三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)早期珍珠色泽形成的影响\*

韩继卫<sup>1</sup> 罗文<sup>1</sup> 郑大恒<sup>1</sup> 张玉明<sup>2</sup>

(1. 绍兴文理学院生命科学学院 绍兴 312000; 2. 浙江省新昌县水产技术推广中心 新昌 312500)

**提要** 采用生理生化、激光拉曼和电镜扫描等方法进行添加不同浓度 $\beta$ -胡萝卜素对三角帆蚌早期珍珠色泽形成的研究。实验共分五组, I至V组 $\beta$ -胡萝卜素终浓度分别为 0、0.000625%、0.00125%、0.0025%和 0.005%。结果显示, 当 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度为 0.000625%时, SOD、POD 的比活力均下降, 而 CAT 的比活力升高; 其早期珍珠在 708 $\text{cm}^{-1}$ 、1088 $\text{cm}^{-1}$  处的  $\text{CaCO}_3$  拉曼峰和 1136 $\text{cm}^{-1}$ 、1528 $\text{cm}^{-1}$  处的 $\beta$ -胡萝卜素拉曼峰强度值最高, 分别为 1761、6003 和 2630、3359, 扫描电镜结果也显示此时珍珠层的文石结晶最好。结果表明, 当三角帆蚌的生长水域中添加 0.000625%浓度的 $\beta$ -胡萝卜素时, 能够有效促进  $\text{CaCO}_3$  文石规则有序地结晶, 较好地提高三角帆蚌早期珍珠的色泽度。

**关键词** 三角帆蚌,  $\beta$ -胡萝卜素, 珍珠, 色泽

**中图分类号** S966.22

珍珠是一种古老的有机宝石, 利用三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)培育无核珍珠已成为我国江浙地区主要的支柱产业之一。虽然现在我国每年的珍珠产量已占全世界的 95%, 但销售额仅为世界珍珠销售总额的 8%(罗文等, 2010), 究其原因, 主要是我国生产的珍珠品质普遍偏低, 个大、圆润、色泽度好的优质珍珠寥寥无几。因此, 如何全面提升珍珠品质, 增加其附加值, 已成为当前珍珠养殖业中亟待解决的问题之一。

珍珠是由三角帆蚌珍珠囊分泌的  $\text{CaCO}_3$  和有机基质按一定比例钙化形成的文石结晶(Manne *et al.*, 1994), 其主要成分是  $\text{CaCO}_3$ , 含量占整个珍珠的 90%—95%, 其次是有机基质如糖蛋白、粘多糖及金属元素等(Weiner *et al.*, 1983)。珍珠拥有与其它宝石不同的特色, 很大程度上归功于它特殊的色泽。珍珠的色泽分为体色与伴色, 体色就是指珍珠的本体颜色, 它取决于有机基质的成分; 伴色是指珍珠层对光的反射干涉等综合作用而形成的晕彩, 因此对珍珠层

中有机基质的研究是了解珍珠层成因及其颜色差别的关键。然而自 20 世纪 70 年代以来, 对珍珠层中有机基质的研究一直侧重于蛋白质的生物化学及分子生物学的研究, 原位研究有机基质的报道极少, 主要原因是珍珠层中的有机基质含量极低, 不易探测。直到 Urmos 等(1991)首次报道在天然珍珠的有机基质中存在类胡萝卜素, 且推测类胡萝卜素是珍珠成色的重要原因之一; 随后, 张刚生等(2001)也对天然珍珠层中的有机基质进行激光拉曼光谱分析, 发现类胡萝卜素的浓度与珍珠及珍珠层的颜色密切相关; 以后又有类胡萝卜素能够增加水产动物的体色, 使其更加红润亮丽的报道(Buttle *et al.*, 2001)。但是, 类胡萝卜素影响育珠贝生理代谢和生物矿化, 进而影响  $\text{CaCO}_3$  文石结晶和有机基质的原理还未见报道。因此, 本研究通过在三角帆蚌生长水域中添加不同浓度的 $\beta$ -胡萝卜素( $\beta$ -Carotene), 观察其对早期珍珠色泽形成的影响, 以期在实际生产中提高珍珠色泽度提供理论依据。

\* 浙江省自然科学基金项目资助, Y3110038 号; 绍兴市科技局科研项目资助, 2008A32003 号, 2011B60009 号。韩继卫, 助理实验师, E-mail: hanjiwei2000@sina.com

通讯作者: 罗文, 博士, 副教授, E-mail: luowenbosi@163.com

收稿日期: 2010-09-26, 收修改稿日期: 2010-11-29

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 实验动物和分组** 刚植片的 1 龄健康三角帆蚌 200 只, 于 2010 年 5 月取自绍兴诸暨山下湖, 经 1 周的适应性饲养后, 随机取 150 只分成 5 组, 编号为 I、II、III、IV、V。每组设 3 个平行组, 每个平行组 10 只, 分别饲养在水族箱中, 每个水族箱放入曝气后的池塘水各 0.5m<sup>3</sup>。在 II、III、IV、V 水族箱中添加  $\beta$ -胡萝卜素, 使其终浓度分别为 0.000625%、0.00125%、0.0025% 和 0.005%, I 号为空白对照组(不添加  $\beta$ -胡萝卜素)。

按照三角帆蚌的养殖方法进行日常养殖和管理, 控制好温度、溶氧量、pH、微量元素及饵料等环境因子, 使其保持基本恒定。每天观察水体是否新鲜, 并适时换水, 添加  $\beta$ -胡萝卜素至初始浓度, 饲养 30d, 剖检。

**1.1.2 实验药品** 10%  $\beta$ -胡萝卜素(内含 VE 油、大豆油、淀粉、糊精)购自浙江桐乡市天和诚食品科技有限公司; 丙酮、石油醚均购自上海生化试剂厂; SOD、CAT、POD 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

### 1.2 方 法

**1.2.1 三角帆蚌外套膜组织中 $\beta$ -胡萝卜素含量的测定** 从以上各组中分别取三角帆蚌 6 只, 解剖, 分别取外套膜 1.5g(其余备用), 匀浆后, 溶在 10ml 丙酮和石油醚混合液(4 : 1)中, 将该混合物放入离心管内 5000r/min 离心 5min, 取上清液, 将沉淀溶在 5ml 丙酮和石油醚混合液(3 : 7)中, 再次离心, 反复抽提 3 次。将每次所得上清液移入分液漏斗中, 加入等体积的饱和食盐水溶液, 静置分层后放掉下层的水、丙酮和盐溶液层, 并用蒸馏水冲洗色素石油醚层 5 次, 以彻底洗去丙酮和盐。然后将其移入比色管中, 用石油醚定容至 10ml。石油醚做空白对照, 采用可见分光光度计测定 350—600nm 处的吸光度值, 取平均值。同时按以下公式计算最大吸光度处外套膜组织中 $\beta$ -胡萝卜素的含量(Hart *et al.*, 1995)。

$$X = (1000A \times V) / (E_{\beta} \times W)$$

式中:  $X$  为总 $\beta$ -胡萝卜素含量(mg/kg);  $A$  为测得的吸光度值;  $V$  为样品最后定容的体积(ml);  $W$  为所称样品重量(g);  $E_{\beta}$  为 $\beta$ -胡萝卜素的消光系数, 为 2500。

**1.2.2 三角帆蚌外套膜组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(CAT)、过氧化氢酶(POD)比活力的测定** 取上述备用的外套膜组织 0.2—1g, 在冰

冷的 0.86% 生理盐水中漂洗后, 制备 10% 匀浆液, 5000r/min 离心 10min, 取上清液按照试剂盒说明书对每个样品进行吸光度测定后, 按以下公式计算 SOD、CAT、POD 酶的比活力(U/g), 利用 SPSS17.0 统计软件对数据进行方差分析。

SOD 酶的比活力 = (测定管 OD 值 - 对照管 OD 值)  $\div$  对照管 OD 值  $\div$  50%  $\times$  反应体系的稀释倍数  $\div$  待测样本匀浆液蛋白含量;

CAT 酶的比活力 = (对照管 OD 值 - 测定管 OD 值)  $\times$  271  $\times$   $\frac{1}{60 \times \text{取样量}}$   $\div$  待测样本匀浆液蛋白含量;

POD 酶的比活力 = (测定管 OD 值 - 对照管 OD 值)  $\div$  12  $\times$   $\frac{\text{反应液总体积(ml)}}{\text{样本量(ml)}}$   $\div$  反应时间  $\div$  待测样本匀浆液蛋白含量  $\times$  1000。

**1.2.3 三角帆蚌早期珍珠激光拉曼光谱的测定** 在上述取样的同时每只蚌随机取珍珠 2 颗, 浸泡在 5% NaOCl 溶液中 10min 后用蒸馏水冲洗干净, 风干。送南京大学采用 T64000 激光拉曼光谱仪, 在 514nm 激发光下, 200—2500cm<sup>-1</sup> 扫描珍珠, 记录数据。

**1.2.4 三角帆蚌早期珍珠层扫描电子显微镜的观察** 在上述取样的同时每只蚌随机取珍珠 2 颗, 浸泡在 5% NaOCl 溶液中 10min 后用蒸馏水冲洗干净, 烘干。置于样品台上, 喷金 200Å 左右, 采用 Hitachi-7650 扫描电子显微镜, 对珍珠层进行观察, 记录结果。

## 2 结 果

### 2.1 三角帆蚌外套膜组织中 $\beta$ -胡萝卜素的含量

由图 1 可知, 当 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度为 0—0.005% 时, 三角帆蚌外套膜组织在 422nm、432nm 和 444nm 处均出现  $\beta$ -胡萝卜素特异的三指吸收峰, 并且吸光度值 422nm > 432nm > 444nm; 当 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度为 0、0.000625%、0.00125%、0.0025%、0.005% 时, 三角帆蚌外套膜组织在 422nm 处的吸光度值分别为 0.42(图 1A)、0.79(图 1B)、1.06(图 1C)、1.32(图 1D)、1.03(图 1E), 经计算, 其 $\beta$ -胡萝卜素的含量分别为 1.12、2.11、2.83、3.51、2.75mg/kg; 当 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度为 0—0.0025% 时, 三角帆蚌外套膜组织中的 $\beta$ -胡萝卜素含量与添加浓度呈正相关。

### 2.2 三角帆蚌外套膜组织中 SOD、CAT、POD 酶的比活力

由表 1 可知, 三角帆蚌外套膜组织中 SOD 酶的比活力, 1 号组最高, 为(415.31 $\pm$ 35.09)U/g, 2 号组

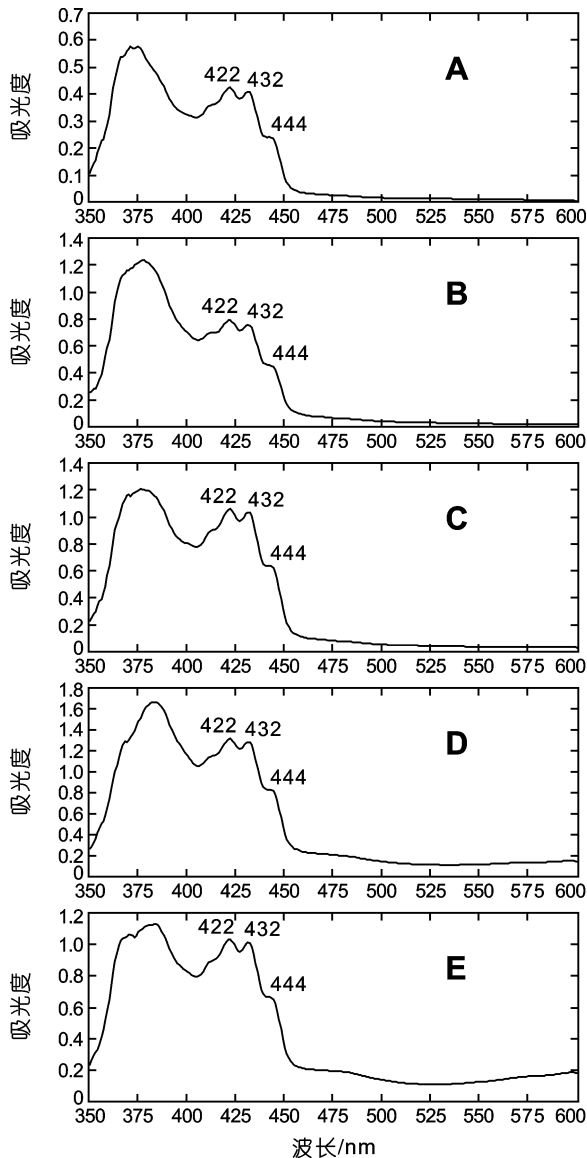


图1 三角帆蚌外套膜组织中β-胡萝卜素的吸光谱

Fig.1 Absorption spectra of β-carotene in mantle tissue of *H. cumingii*

注: β-胡萝卜素浓度, A 为 0, B 为 0.000625%, C 为 0.00125%, D 为 0.0025%, E 为 0.005%

最低, 为(176.59±21.38)U/g。除对照组外, 不同浓度β-胡萝卜素中的三角帆蚌, 其外套膜组织中 SOD 酶

的比活力差异显著( $P<0.05$ )。且随着β-胡萝卜素浓度的升高, 从 号组到 号组 SOD 酶的比活力与β-胡萝卜素浓度成正相关。

CAT 酶的比活力, 号组最高, 为(53.77±0.66)U/g, 此后随着β-胡萝卜素浓度的增加, 比活力逐步降低。、组外套膜组织中 CAT 酶的比活力差异显著( $P<0.05$ )。

POD 酶的比活力, 号组最高, 为(141.25±21.45)U/g, 号组最低, 为(31.24±4.72)U/g, 从号组到号组 POD 酶的比活力与β-胡萝卜素浓度成正相关。、组外套膜组织中 POD 酶的比活力差异不显著( $P>0.05$ );、组则差异显著( $P<0.05$ )。

### 2.3 三角帆蚌早期珍珠的激光拉曼光谱

由图 2 可知, 当β-胡萝卜素的添加浓度为 0—0.005%时, 三角帆蚌早期珍珠在 705—710 $\text{cm}^{-1}$ , 1088—1091 $\text{cm}^{-1}$  范围内分别出现由  $\text{CaCO}_3$  引起的特征峰, 在 1132—1136 $\text{cm}^{-1}$ , 1527—1528 $\text{cm}^{-1}$  范围内分别出现由β-胡萝卜素 C—C 和 C=C 伸缩振动引起的特征峰; 当β-胡萝卜素的添加浓度为 0.000625%时, 在 708 $\text{cm}^{-1}$ 、1088 $\text{cm}^{-1}$ 、1136 $\text{cm}^{-1}$ 、1528 $\text{cm}^{-1}$  处的拉曼峰强度值最高, 分别为 1761、6003、2630、3359 (图 2B)。此后随着β-胡萝卜素浓度的升高,  $\text{CaCO}_3$  引起的拉曼峰强度值和β-胡萝卜素引起的拉曼峰强度值均降低。当β-胡萝卜素的添加浓度为 0.0025%和 0.005%时, 尽管  $\text{CaCO}_3$  引起的拉曼峰强度值略高于对照组, 但它们都在 1091 $\text{cm}^{-1}$  处出现  $\text{CaCO}_3$  的特征峰(图 2D, 图 2E)。

### 2.4 三角帆蚌早期珍珠层的扫描电子显微镜观察

由图 3 可见, 当β-胡萝卜素的添加浓度为 0.000625%时, 三角帆蚌珍珠层的文石结晶最好, 文石晶片呈正六边形, 形状清晰、界限分明、边缘平直、厚重饱满, 直径 3.0—4.0 $\mu\text{m}$ ; 从裸露的次表层可见, 次表层仍为正六边形晶片构成, 次表层排列的非常平整、均匀, 外表层的六边形晶片成核于次表层的六边形晶片之上, 珍珠层由结构相同的正六边形晶片

表 1 三角帆蚌外套膜组织中 SOD、CAT、POD 酶的比活力(U/g, n=6)

Tab.1 Enzyme specific activities of SOD, CAT, POD in mantle tissue of *H. cumingii*

酶	组别				
	1	2	3	4	5
SOD	328.37±26.95 <sup>bc</sup>	284.94±31.67 <sup>b</sup>	345.59±22.21 <sup>c</sup>	415.31±35.09 <sup>d</sup>	176.59±21.38 <sup>a</sup>
CAT	38.71±1.38 <sup>c</sup>	53.77±0.66 <sup>d</sup>	29.30±0.89 <sup>bc</sup>	21.76±1.24 <sup>b</sup>	13.50±0.84 <sup>a</sup>
POD	123.79±19.72 <sup>bc</sup>	31.24±4.72 <sup>a</sup>	51.53±12.13 <sup>a</sup>	69.45±4.99 <sup>a</sup>	141.25±21.45 <sup>c</sup>

注: 数值为平均值±标准差, 同一列中数值肩字母不同表示之间有显著差异( $P<0.05$ , a < b < c < d)

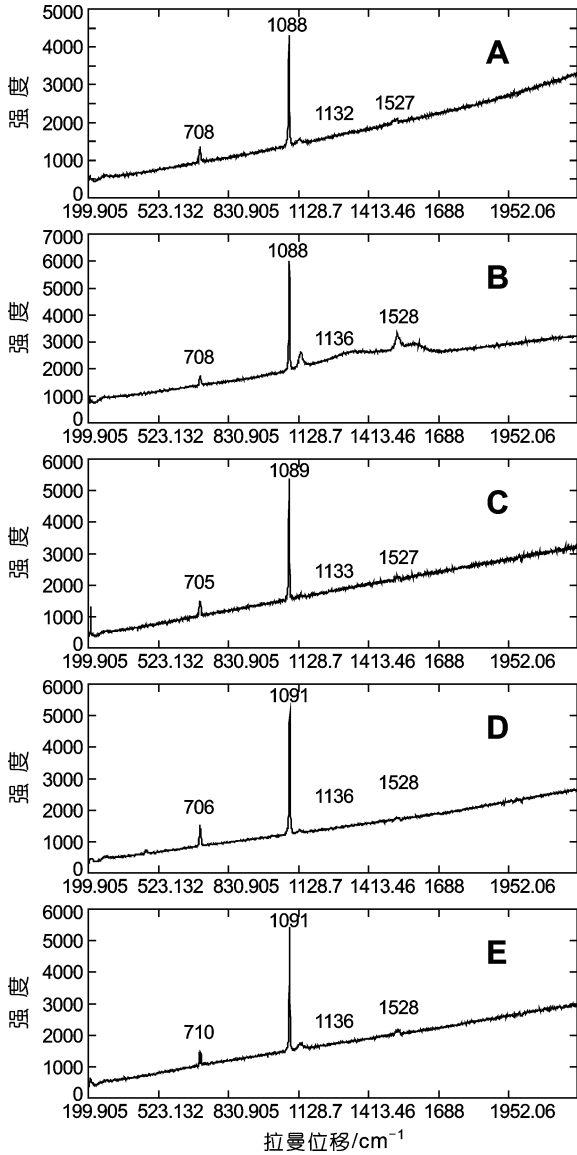


图2 三角帆蚌早期珍珠的激光拉曼光谱

Fig.2 Laser Raman spectra of early pearl in *H. cumingii*  
注:  $\beta$ -胡萝卜素浓度, A 为 0, B 为 0.000625%, C 为 0.00125%, D 为 0.0025%, E 为 0.005%

构成微层, 微层层层排列, 结构紧密, 分层现象明显, 整个珍珠文石层表面平整(图 3b)。

当 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度为 0 时, 三角帆蚌珍珠层的文石晶片呈近六边形、近圆形, 直径 3.0 $\mu\text{m}$ , 大小较均匀, 排列较整齐, 文石晶片呈层状排列(图 3a)。当 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度为 0.00125%—0.005% 时, 随着 $\beta$ -胡萝卜素浓度的增加, 三角帆蚌珍珠层的文石结晶越来越差, 文石晶片呈圆形、近圆形, 颗粒状, 大小不一, 直径小于 3.0 $\mu\text{m}$ , 珍珠层中有机基质的含量非常高, 高浓度的有机基质将文石晶片胶结在一起, 分层现象极不明显(图 3c, 图 3e)。

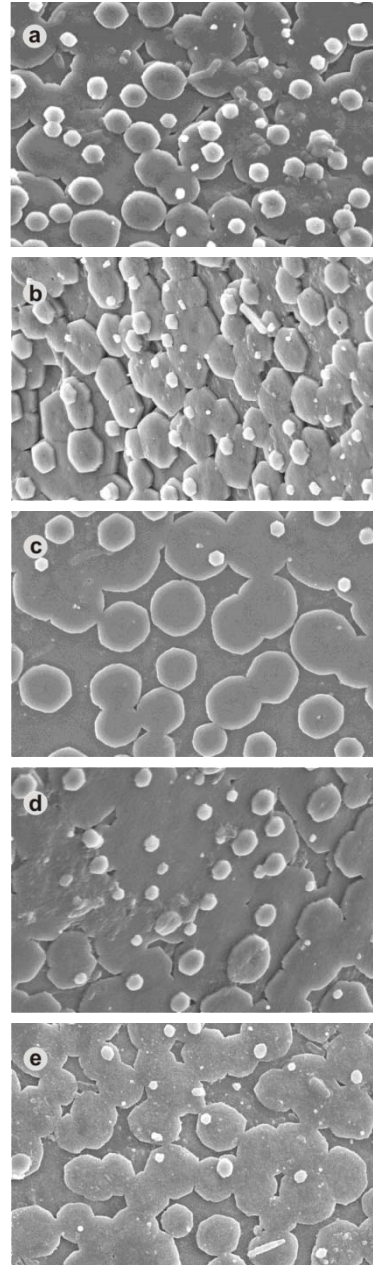


图3 三角帆蚌珍珠层扫描电子显微镜图( $\times 5000$ )

Fig.3 Pictures of scanning electronic microscope ( $\times 5000$ ) on nacre of *H. cumingii*

注:  $\beta$ -胡萝卜素浓度, a 为 0, b 为 0.000625%, c 为 0.00125%, d 为 0.0025%, e 为 0.005%

当 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度为 0.0025% 时, 422nm 处的吸光度值最大(图 1D), 三角帆蚌外套膜组织中 $\beta$ -胡萝卜素的含量为 3.51mg/kg, 而后下降, 这与 Chien 等(1992)、Christiansen 等(1995)及何培民等(1999)的研究结果相一致。这充分说明在三角帆蚌养殖水体中添

### 3 讨论

#### 3.1 三角帆蚌外套膜组织中 $\beta$ -胡萝卜素的累积

$\beta$ -胡萝卜素是 500 多种类胡萝卜素中一种不含氧的类型, 由碳氢组成, 属烃类色素, 它在水生动物体内的积聚对其体色会产生一定的影响(郝之奎等, 2007; 周凡等, 2007)。本研究中, 三角帆蚌外套膜组织在 422nm、432nm 和 444nm 处出现 $\beta$ -胡萝卜素特异的三指吸收峰(图 1), 这与 Britton (1985) 报道相一致。 $\beta$ -胡萝卜素在提取的过程中由于光照或氧化, 其吸收峰可能会出现蓝移或红移现象, 因而本实验在 422 nm、432nm 和 444 nm 处出现吸收峰。

同时, 当  $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度为 0%—0.0025% 时, 随着浓度的增加, 三角帆蚌外套膜组织的吸光度值与添加浓度呈正相关, 当 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度为 0.0025% 时, 422nm 处的吸光度值最大(图 1D), 三角帆蚌外套膜组织中 $\beta$ -胡萝卜素的含量为 3.51mg/kg, 而后下降, 这与 Chien 等(1992)、Christiansen 等(1995)及何培民等(1999)的研究结果相一致。这充分说明在三角帆蚌养殖水体中添

加适量的 $\beta$ -胡萝卜素能够促进其在外套膜组织中的累积。但这种累积不是无止境的,当达到一定阈值时,过多的 $\beta$ -胡萝卜素作用适得其反。

另外,对于 $\beta$ -胡萝卜素的生物利用率而言,当 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度从 0%增加到 0.000625%时,三角帆蚌外套膜组织中的 $\beta$ -胡萝卜素含量增加 1.88 倍;当 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度从 0.000625%增加到 0.00125%时,三角帆蚌外套膜组织中的 $\beta$ -胡萝卜素含量只增加 1.34 倍,而后随着 $\beta$ -胡萝卜素添加量的增大,三角帆蚌对 $\beta$ -胡萝卜素的生物利用率逐渐降低。这可能是因为 $\beta$ -胡萝卜素在动物体内的吸收处于动态平衡,当 $\beta$ -胡萝卜素进入动物体内后,首先与 $\beta$ -胡萝卜素载体如高密度脂蛋白结合,这些载体具有饱和性,开始时环境中的 $\beta$ -胡萝卜素浓度略微增加,由于大多数载体均未饱和,因此 $\beta$ -胡萝卜素的生物利用率就高,而后随着可利用的载体越来越少, $\beta$ -胡萝卜素的生物利用率就逐渐降低。总之,在一定范围内三角帆蚌体内的 $\beta$ -胡萝卜素含量会随着添加浓度的升高而增加,但不会无限增加,当 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度达到一定量后,三角帆蚌体内的 $\beta$ -胡萝卜素含量将不会再增加。

### 3.2 三角帆蚌外套膜组织中 SOD、CAT、POD 酶的比活力

需氧生物体内都含有抗氧化防御系统,这个系统能防止活性氧自由基的过量产生,并且受环境的诱导和阻遏双向调控。它由一些能够被氧化应激诱导的酶类组成,其中 SOD、POD 和 CAT 是这个防御系统的重要组分。这三种酶相互协调,处于一种动态平衡状态,从而使生物体内的自由基维持在较低水平。Fridovich(1977)将以上三种酶统称为保护酶系统,其活性的变化可以作为环境因子对机体的伤害指标。

本研究结果显示,当 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度为 0.000625%时,三角帆蚌体内的 SOD 酶比活力低于对照组,随着 $\beta$ -胡萝卜素浓度的增加,SOD 酶的比活力升高,当 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度为 0.005%时,三角帆蚌体内的 SOD 酶比活力降至最低(表 1),这与 Dyrynda 等(1998)的研究结果一致。 $\beta$ -胡萝卜素作为抗氧化剂,具有良好的抗氧化生物活性,由于 $\beta$ -胡萝卜素的参与,三角帆蚌不再需要大量的 SOD 酶来参与抗氧化,因而添加 0.000625%的 $\beta$ -胡萝卜素,三角帆蚌体内的 SOD 酶比活力低于对照组;然而 $\beta$ -胡萝卜素对三角帆蚌的影响也具有两面性,当少量添加时对机体有益,当超过一定阈值时,对三角帆蚌就具

有一定毒害作用,三角帆蚌不得不启动自身的防御系统抵抗外界环境对其不良影响。因而,在 0.00125%—0.0025%的添加浓度时, $\beta$ -胡萝卜素已变成诱导剂,迫使三角帆蚌体内的 SOD 酶过量表达,比活力升高,且高于对照组;当 $\beta$ -胡萝卜素浓度为 0.005%时,此时的 $\beta$ -胡萝卜素已经对三角帆蚌造成极大伤害,导致体内的 SOD 酶活性被阻遏,因此 SOD 酶的比活力突然下降。

同样对于 POD 酶的比活力,在 0.000625%时最低,而后随着 $\beta$ -胡萝卜素浓度的升高,POD 酶的比活力也升高(表 1),此时添加的 $\beta$ -胡萝卜素对三角帆蚌还具有有益作用,但当 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度为 0.005%时,POD 酶的比活力高于对照组,此时添加的 $\beta$ -胡萝卜素已经对三角帆蚌产生不良作用,三角帆蚌通过自身的调节,抵抗外界不良环境,这一过程反应出 $\beta$ -胡萝卜素对三角帆蚌的作用是双向的,同时 POD 酶对 $\beta$ -胡萝卜素的耐受性优于 SOD 酶。

对于 CAT 酶的比活力,本研究显示与 SOD 酶负相关,当 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度大于 0.000625%时,在 $\beta$ -胡萝卜素的胁迫下,三角帆蚌体内产生大量的 $O_2^-$ 等超氧化物,这些有害的超氧阴离子自由基能被 SOD 分解(黄鹤忠等,2006; Diguiseppi *et al*, 1984),而 $O_2^-$ 自由基本身对 CAT 酶具有抑制作用,从而导致 CAT 酶比活力降低(Digiulio *et al*, 1989),因此本研究中,随着 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度增加,CAT 酶的比活力逐渐降低,并且与 SOD 酶呈负相关。

### 3.3 $\beta$ -胡萝卜素对三角帆蚌早期珍珠结晶的影响

本研究对三角帆蚌珍珠进行激光拉曼扫描,结果显示在 705—710 $cm^{-1}$ 、1088—1091 $cm^{-1}$  范围内分别出现由  $CaCO_3$  引起的特征峰,在 1132—1136 $cm^{-1}$ 、1527—1528 $cm^{-1}$  范围内分别出现由 $\beta$ -胡萝卜素 C—C 和 C=C 伸缩振动引起的特征峰(图 2),这与 Sarto 等(1983)、Merim 等(1986)、Gauldie 等(1997)的研究结果一致。当 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度为 0.000625%时,在 708 $cm^{-1}$  和 1088 $cm^{-1}$  处的  $CaCO_3$  拉曼峰与 1136 $cm^{-1}$  和 1528 $cm^{-1}$  处的 $\beta$ -胡萝卜素拉曼峰强度值最高(图 2B),这表明 0.000625% 的添加浓度能够有效地在三角帆蚌珍珠上形成 $\beta$ -胡萝卜素的沉淀,促进 Ca 的吸收和沉积。当 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度为 0.0025% 和 0.005%时,尽管也在 1091 $cm^{-1}$  处出现  $CaCO_3$  特征峰,且强度值略高于对照组(图 2D, 2E),但它们都是由  $CaCO_3$  的方解石结晶引起的,并不是形成光泽亮丽珍珠的文石结晶。

在本研究中珍珠层的电子显微镜扫描图片也进一步证实了以上的结论。当 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度为0.000625%时,三角帆蚌珍珠层的文石结晶最好,在每一单层内文石晶体像马赛克拼盘一样有序排列,有机基质在其空隙中将它们粘结成层,珍珠层中文石晶体的大小、厚度以及珍珠层单层厚度均匀,文石层表面平整(图3b),这就增加了珍珠表面的镜反射进而提高了珍珠的光泽度,同时文石晶体层间致密(图3b),这说明胶结的有机基质含量较少,这有利于降低珍珠对入射光的吸收从而增强珍珠的晕彩。另外对于1132—1136 $\text{cm}^{-1}$ 和1527—1528 $\text{cm}^{-1}$ 两处的拉曼峰,均为典型的全反式共轭双键 $\beta$ -胡萝卜素特征峰,该峰的相对强度与珍珠层的颜色密切相关,即珍珠颜色越深相对强度越大(张刚生等,2000,2001)。在本研究中当 $\beta$ -胡萝卜素的添加浓度为0.000625%时,所形成的 $\beta$ -胡萝卜素拉曼峰强度值最大,这表明此浓度下形成的珍珠本体颜色最深,浮于珍珠表面的各种晕彩也更容易显现。

综上所述,当三角帆蚌的生长水域中添加0.000625%的 $\beta$ -胡萝卜素,能够有效地防止三角帆蚌体内氧自由基的产生,促进 $\text{CaCO}_3$ 文石规则有序的结晶,较好地沉积在珍珠层中,从而能有效地提高三角帆蚌早期珍珠的色泽度。

**致谢** 本文中的激光拉曼光谱和电镜扫描分别得到南京大学沈剑沧老师和绍兴文理学院分析测试中心王林霞老师的帮助,本校生命科学学院学生龙考莉、潘人杰、张雪峰也参与了部分工作,谨致谢忱。

### 参 考 文 献

- 何培民,张饮江,何文辉,1999.螺旋藻对锦鲤生长和体色的影响.水产学报,23(2):162—168
- 张刚生,谢先德,2000.贝壳珍珠层微结构及成因理论.矿物岩石,23(1):11—16
- 张刚生,谢先德,2001.我国主要育珠贝(蚌)贝壳珍珠层及珍珠的激光拉曼光研究.光谱学与光谱分析,21(2):193—196
- 罗文,杨受保,丁盈等,2010.三角帆蚌珍珠形成初期钙代谢的特征分析.海洋与湖沼,41(6):895—900
- 周凡,邵庆均,马晶晶等,2007.影响类胡萝卜素在水产动物体内利用的因素.水产养殖,13:41—44
- 郝之奎,王嫣,顾志峰等,2007.珍珠颜色的研究进展.安徽农业科学,35(11):3260—3261
- 黄鹤忠,李义,宋学宏等,2006.氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫功能的影响.海洋与湖沼,37(3):198—204
- Britton G, 1985. General Carotenoids Methods. In: Law J H, Rilling H C ed. Steroids and Isoprenoids (Part B). Orlando: Academic Press, 113—149
- Buttle L G, Crampton V O, Williams P D, 2001. The effect of feed pigment type on flesh pigment deposition and colour in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Aquaculture Research, 32: 103—111
- Chien Y H, Jeng S C, 1992. Pigmentation of kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes. Aquaculture, 102: 333—346
- Christiansen R, Lie O, Torrissen O J, 1995. Growth and survival of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed different dietary levels of astaxanthin. Aquaculture Nutrition, 1: 189—198
- Digiulio R T, Washburn P C, Wenning R J *et al*, 1989. Biochemical response in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. Environmental Toxicology and Chemistry, (8): 1103—1123
- Diguiseppi J, Fridovich I, 1984. The toxicology of molecular oxygen. Crit Rev Toxicol, 12(4): 315—342
- Dyrynda E A, Pipe R K, Burr G R *et al*, 1998. Modulations in the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK. Aquatic Toxicology, 42: 169—185
- Fridovich I, 1977. Oxygen is toxic. Bioscience, 27(7): 462—465
- Gauldie R W, Sharma S K, Volk E, 1997. Micro-Raman spectral study of vaterite and aragonite otoliths of CoHo salmon, *Oncorhynchus kisutch*. Comp Biochem Phys, 118A(31): 753—757
- Hart D J, Scott K J, 1995. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. Food Chemistry, 54: 101—111
- Manne S, Zaremba C M, Giles R *et al*, 1994. Atomic force microscopy of the nacreous layer in mollusk shells. Proc R Soc, 256B: 17—23
- Merim J C, Dele-dubois M L, 1986. Resonance Raman characterization of polyactylenic pigments in the calcareous skeleton. Comp Biochem Phys, 84B(1): 97—103
- Sarto S, Tasum M, Eugster C H, 1983. Resonance Raman spectra (5800—40 $\text{cm}^{-1}$ ) of all-trans and 15 cis isomers of  $\beta$ -carotene in the solid state and in solution Measurements with various laser lines from ultraviolet to red. J Raman Spectroscopy, 14(5): 299—309
- Urmos J, Sharma S K, Mackenzie F T, 1991. Characterization of some biogenic carbonates with Raman spectroscopy. Amer Mineralogist, 76: 641—646
- Weiner S, Traub W, Lowenstam H A, 1983. Organic Matrix in Calcified Exoskeletons. In: Westbroek P, Dejong E W ed. Biomineralization and Biological Metal Accumulation. Holland: D Reidel Publishing Company, 205—224

## THE EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF $\beta$ -CAROTENE ON EARLY PEARL COLOR AND LUSTRE DEGREES IN *HYRIOPSIS CUMINGII*

HAN Ji-Wei<sup>1</sup>, LUO Wen<sup>1</sup>, ZHENG Da-Heng<sup>1</sup>, ZHANG Yu-Ming<sup>2</sup>

(1. School of Life Sciences, Shaoxing University, Shaoxing, 312000; 2. Xinchang County Aquaculture Technology Promotion Center, Xinchang, 312500)

**Abstract** Physiological and biochemical, laser Raman and scanning electron microscopy methods were used to investigate the effect of different concentrations of  $\beta$ -carotene on early pearl color formation in *Hyriopsis cumingii*. The experiment was divided into five groups, the last concentrations of  $\beta$ -carotene was 0, 0.000625%, 0.00125%, 0.0025% and 0.005% respectively. The results showed that SOD and POD enzyme specific activity were decreased, but CAT enzyme specific activity was increased when the concentration of  $\beta$ -carotene was 0.000625%. At the same concentration, the intensity values of  $\text{CaCO}_3$  laser Raman peak in  $708\text{cm}^{-1}$  and  $1088\text{cm}^{-1}$ ,  $\beta$ -carotene laser Raman peak in  $1136\text{cm}^{-1}$  and  $1528\text{cm}^{-1}$  were all the highest. They were 1761, 6003, 2630, 3359 respectively. The nacre aragonite crystal was also verified the best by scanning electron microscopy. The results suggested that the concentration of 0.000625%  $\beta$ -carotene can effectively promote the orderly crystallization of  $\text{CaCO}_3$  aragonite and optimum enhanced the early pearl's color and lustre degrees in *H. cumingii*.

**Key words** *Hyriopsis cumingii*,  $\beta$ -carotene, Pearl, Color and lustre